

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
ARSTITEADUSKOND
MIKROBIOLOOGIA INSTITUUT

Magda Karakai

**Stafülokokkide metitsilliin-resistentsus enneaegsete ja ajaliste
vastsündinute emade rinnapiimas**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Hiie Soeorg, MD

prof. Jaanus Remme

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1.Stafülokokkide iseloomustus.....	7
1.1.1.Morfoloogia.....	7
1.1.2.Füsioloogia.....	7
1.1.3.Jaotus koagulaasi alusel.....	8
1.1.4.Koagulaas-positiivsed stafülokokid.....	8
1.1.5.Koagulaas-negatiivsed stafülokokid.....	9
1.2.Stafülokokid inimese normaalses mikroflooras.....	11
1.2.1.Stafülokokid naha mikroflooras.....	11
1.2.2.Stafülokokid seedetrakti mikroflooras.....	12
1.2.3.Stafülokokid rinnapiimas.....	12
1.3.Stafülokokid enneaegsete vastsündinute haigustekitajatena.....	13
1.3.1.Stafülokokkide osa hilise sepsise tekkes	13
1.3.2.Hilist sepsist tekitavate tüvede allikas.....	14
1.3.3.Rinnapiimas leiduvad stafülokokid (<i>S. aureus</i>) hilise sepsise põhjustajana.....	15
1.3.4.Kas rinnapiimas leiduvad stafülokokid on vastsündinu jaoks ohutud?.....	15
1.4.Haiglas vs kodus levivate stafülokokkide antibiootikumitundlikkus.....	16
1.4.1.Stafülokokkide resistentsus haiglas ja väljaspool haiglat.....	16
1.4.2.Haiglas viibivate patsientide koloniseerumine resistentsete mikroobidega.....	17
1.4.3.Resistentsed tüved hospitaliseeritud vastsündinute emade rinnapiimas.....	18
1.5.Metitsilliin-resistentsus.....	18
1.5.1.Resistentsusmehhanism.....	18
1.5.2.Erinevate stafülokokkide metitsilliin-resistentsus.....	19
1.5.3.Metitsilliin-resistentsust kodeerivad geenid.....	19
1.5.4.Resistentsuse levik ja koagulaas-negatiivsete stafülokokkide tähtsus selles.....	20
2.EKSPERIMENTAALOSA.....	21
2.1.Töö eesmärgid.....	21
2.2.Materjal ja metoodika.....	21
2.2.1.Uuritavad.....	21
2.2.2.Proovide kogumine ja säilitamine.....	23

2.2.3.Liigi tasemele identifitseerimine.....	23
2.2.4.DNA eraldamine.....	23
2.2.5.PCR (polümeraasi ahelreaktsioon).....	23
2.2.6.DNA geelelektroforees.....	25
2.3.Tulemused.....	25
2.4.Arutelu.....	28
KOKKUVÕTE.....	31
METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI IN BREAST MILK OF MOTHERS OF PRETERM AND TERM NEONATES. SUMMARY.....	32
KIRJANDUS.....	34
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	41
LIHTLITSENTS.....	44

KASUTATUD LÜHENDID

MALDI – maatriksainega vahendatud laser-ioniseerimine ja desorptsioon (ingl. k. *matrix assisted laser desorption/ionization*)

mecA – klass A *mec* geen

PBP2a – penitsilliini siduv valk 2a (ingl. k. *penicillin-binding protein 2a*)

SCC – stafülokokki kassettkromosoom (ingl. k. *staphylococcal cassette chromosome*)

SCC*mec* – *mecA* geeni sisaldav stafülokokki kassettkromosoom (ingl. k. *staphylococcal cassette chromosome mec*)

TAE – tris-atsetaat-EDTA (ingl. k. *tris-acetate-EDTA*)

TOF MS – lennuaja mass-spektromeeter (ingl. k. *time-of-flight mass spectrometer*)

SISSEJUHATUS

Stafülokokid on grampositiivsed bakterid, keda leidub looduslikult peamiselt soojavereliste loomade nahanäärmetel ja limaskestadel. Vastavalt sellele, kas stafülokokid toodavad ensüümi nimega koagulaas või mitte, jaotuvad nad koagulaas-positiivseteks ja koagulaas-negatiivseteks. Esimene rühm, koagulaas-positiivsed stafülokokid, on oportunistlikud patogeenid, mis, sattununa inimese organismi, võivad põhjustada tõsiseid infektsioone. Koagulaas-negatiivsed stafülokokid moodustavad suure osa inimese normaalsest mikrofloorast ja on koagulaas-positiivsetest liikidest vähem virulentsed, aga nad on siiski oportunistlikud patogeenid ning viimaste aastakümnete jooksul on oluliselt suurenenud nende osakaal haiglainfektsioonide põhjustamises. Kõige sagedamini on nakkusjuhud seotud seespidiste meditsiiniseadmete, näiteks kateetrite kasutamisega. (Lutsar jt., 2007; Schleifer ja Bell, 2009)

Koagulaas-positiivsetest stafülokokkidest võib inimese organismist leida peamiselt *S. aureus*'t, mida kannab umbes 30% inimestest, peamiselt täiskasvanud (Asquith ja Harrod, 1979; Schleifer ja Bell, 2009). Koagulaas-negatiivsete stafülokokkidega koloniseerub 99% vastsündinuid juba kolme esimese elupäeva jooksul (Björkqvist jt., 2010; Capone jt., 2011).

Stafülokokke esineb ka rinnapiimas, kust nad satuvad imetamise ajal vastsündinu seedetrakti (Jimenez jt., 2008). Samas võivad rinnapiimas leiduvad stafülokokid, peamiselt *S. aureus*, põhjustada enneaegsetel vastsündinutel infektsioone (Kayıran jt., 2014). Koagulaas-negatiivseid stafülokokke peetakse tavaliselt ohututeks ja on oletatud, et nad kaitsevad organismi *S. aureus*'e ülemäärase arvukuse eest (Witt jt., 2014). Nad võivad aga ohustada enneaegseid vastsündinuid, kelle immuunsüsteem on veel välja kujunemata (McElroy ja Weitkamp, 2011).

Sepsis on süsteemne põletikureaktsioon vastusena bakterite põhjustatud infektsioonile (MedlinePlus). Hilise algusega sepsisesse nakatub vastsündinu tavaliselt rohkem kui 72 tundi pärast sündi ning seda põhjustavad keskkonnatingimused ja naha sünnijärgne mikrofloora (Dong ja Speer, 2014). Hilise algusega sepsis põhjustab vastsündinutel, eriti enneaegsetel vastsündinutel, raskeid tüsistusi ning sepsisesse nakatunud vastsündinute suremus on rohkem kui poole võrra suurem nakatumata vastsündinute suremusest (Stoll jt., 2002).

Viimaste aastakümnete jooksul on stafülokokkide resistentsus antibiootikumide suhtes kiiresti

kasvanud (Martins ja Cunha, 2007). Stafülokokkide metitsilliin-resistentsust põhjustab *mecA* geen, mis muudab bakteri resistentseks kõigile β -laktaamantibiootikumidele (Marathe jt., 2015).

Kuna hilise algusega sepsis on jätkuvalt üks vastsündinute haigestumise ja surma põhjusi, hoolimata edusammudest intensiivravis (Stoll jt., 2002), on oluline teada, kuidas stafülokokid, eriti antibiootikumiresistentsed stafülokokid rinnapiima ja vastsündinute organismi satuvad. Stafülokokkide antibiootikumiresistentsus on haiglas tunduvalt kõrgem kui väljaspool haiglat (Hira jt., 2007; Du jt., 2013; Ternes jt., 2013). See lubab oletada, et vastsündinud ja emad koloniseeruvad resistentsete stafülokokkidega haiglas viibimise ajal. Käesoleva uurimistöö eesmärk on kindlaks teha metitsilliin-resistentsust kodeeriva *mecA* geeni olemasolu stafülokokkidel, kes esinevad intensiivraviosakonda hospitaliseeritud enneaegsete vastsündinute emade rinnapiimas, ning võrrelda tulemusi vastava geeni esinemisega tervete ajaliste vastsündinute emade rinnapiimas leiduvatel stafülokokkidel.

Tänan oma juhendajat Hiie Soeorgu ja prof. Jaanus Remmet ning meeldivat laborikollektiivi.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Stafülokokkide iseloomustus

1.1.1. Morfoloogia

Stafülokokid on kerakujulised bakterid, läbimõõduga 0,5–1,5 mikromeetrit. Tavaliselt jagunevad nad rohkem kui ühel tasapinnal, moodustades ebaregulaarseid gruppe, mis meenutavad kujult viinamarjakobaraid. (Schleifer ja Bell, 2009)

Rakud on gram-positiivsed ja liikumatud. Enamasti on stafülokokid ilma kapslita või on kapsli moodustumine piiratud. (Schleifer ja Bell 2009)

Grampositiivsete bakterite rakuseinad moodustavad umbes 20% raku kuivkaalust ja on suhteliselt lihtsad, võrreldes keerukamate gramnegatiivsete organismidega (Strominger jt., 1959). Nende kahe liigi põhiline erinevus seisnebki rakuseina ehituses: kui grampositiivsete rakkude seinad on kolmekihilised, koosnedes plasmamembraanist, periplasmist ja paksust peptidoglükaankihist, siis gramnegatiivsetel rakkudel on õhuke peptidoglükaani kiht kaetud omakorda veel lipiididerohke välismembraaniga (Beveridge, 1999).

Stafülokokki rakuseina ultrastruktuur ja keemiline koostis sarnaneb teiste grampositiivsete bakterite omaga (Strominger jt., 1959).

Rakusein on paks, tavaliselt 60–80 nanomeetrit ja üsna homogeenne kiht, mille elektrontihedus ei ole väga suur. Sein koosneb peptidoglükaanist, teihhoiinhapetest ja valkudest. (Schleifer ja Bell, 2009)

1.1.2. Füsioloogia

Stafülokokid on fakultatiivsed anaeroobid, katalaas-positiivsed ja oksüdaas-negatiivsed ning võimelised kasvama keskkonnas, kus on 10% naatriumkloriidi ning mille temperatuur on 18–40°C. Nad on kemoorganotroofid. Ainevahetus võib olla nii respiratoorne kui ka fermentatiivne, mõni liik on peamiselt respiratoorne ja mõni peamiselt fermentatiivne. Elektronide transpordisüsteemi moodustavad küllastumata menakinoonid ning tsütokroomid *a* ja *b*. Süsiniku-ja energiaallikatena kasutatakse aminohappeid ja süsivesikuid – osa süsivesikuid saab kasutusele võtta aeroobselt ning selle käigus toodetakse hapet. Glükoosi kääritamisel on enamasti saaduseks piimhape. (Schleifer ja Bell, 2009)

Looduslikult võib stafülokokke leida peamiselt soojavereliste loomade nahanäärmetelt ja limaskestadelt. Stafülokokke on võimalik leida loomsetest saadustest, näiteks lihast, piimast ja juustust, ning ümbritsevast keskkonnast, näiteks väljaheidetest, pinnasest, liivast, tolmust, õhust ja looduslikest veekogudest. Osa liike on oportunistlikud patogeendid, mis võivad põhjustada inimestel ja loomadel infektsioone. (Schleifer ja Bell, 2009)

Tuginedes 16S rRNA järjestuse võrdlevale uurimisele, kuulub perekond *Staphylococcus* hõimkonda *Firmicutes*. Selles hõimkonnas on grampositiivsed bakterid, kellel on madal DNA G+C sisaldus (vähem kui 50 mol%). 16S rRNA järjestuse sarnasus on perekonnasiseselt 93,4–95,3 %. (Schleifer ja Bell, 2009)

Erinevad liigid on genotüübiliselt hästi eraldatud, DNA sarnasus võib olla kuni 60%. Üht liiki eristavad teistest ka mitmesugused fenotüübilised tunnused, näiteks rakuseina koostis, koloonia vorm, erinevate ensüümide tegevus ja molekulaarsed omadused, happe tootmine mitmesugustest süsivesikutest, rasvhapete koostis, vastupanu teatud antibiootikumidele ning toitaineid ja hapnikku puudutavad tingimused. (Schleifer ja Bell, 2009)

1.1.3. Jaotus koagulaasi alusel

Stafülokokid jagunevad kaheks – koagulaas-positiivseteks ja koagulaas-negatiivseteks. Koagulaas-positiivseteks liikideks nimetatakse stafülokokke, mis toodavad ensüümi nimega koagulaas. Need liigid on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* ja *Staphylococcus schleiferi*. Kõik teised stafülokokid on koagulaas-negatiivsed. (Lutsar jt., 2007)

Koagulaas põhjustab koos seerumi faktoritega plasma koagulatsiooni ehk kalgendust. Ensüüm tekitab nakkuskolde ümber fibriinist kaitsevalli, takistades niiviisi mikroobide edasist levikut. Lisaks sadestub tema tegevuse tulemusena stafülokokkide pinnale fibriin, mis kaitseb baktereid fagotsütoosi eest. (Mikelsaar jt., 2006)

1.1.4. Koagulaas-positiivsed stafülokokid

Koagulaas-positiivsed liigid – *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* (sh alaliik *Staphylococcus delphini*) ja *Staphylococcus schleiferi* alaliigid *coagulans* – ning koagulaasmuutlikud liigid – *Staphylococcus hyicus* – on oportunistlikud patogeendid.

(Schleifer ja Bell, 2009)

Staphylococcus aureus esineb põhiliselt primaatidel, aga mõni biotüüp valib oma peremeesorganismiks ka kodulooma või linnu. Inimeste juures või bakterit leida peamiselt ninasõõrmetest. Kandluse protsent varieerub tugevalt, see võib tavatingimustes ulatuda vähem kui 10%-st rohkem kui 40%-ni. (Schleifer ja Bell, 2009)

Staphylococcus intermedius, selle alaliigid *Staphylococcus delphini* ja *Staphylococcus hyicus* ning *Staphylococcus schleiferi* koagulaas-positiivsed alaliigid *coagulans* inimesi tavaliselt ei koloniseeri (Schleifer ja Bell, 2009).

1.1.5. Koagulaas-negatiivsed stafülokokid

Stafülokokkide koagulaas-negatiivsed liigid moodustavad küll olulise osa inimese normaalsest mikrofloorast ja nad on vähem virulentsed kui koagulaas-positiivsed liigid, aga nad on oportunistlikud patogeenid ning viimase kahekümne aasta jooksul on suurenenud nende osa haiglainfektsioonide põhjustamises. Infektsioonide sagenemine on seotud nii asjaoluga, et haiglas on üha rohkem immuunpuudulikkusega patsiente, kui ka seepidiste meditsiiniseadmete, näiteks kateetrite kasutamisega. Stafülokokid põhjustavad näiteks kateetriga seotud vereringeinfektsioone, natiiv- ja proteesklapi endokardiiti, kesknärvisüsteemi šundi ja liigesproteesi infektsioone. (Schleifer ja Bell, 2009; von Eiff jt., 2002)

Koagulaas-negatiivsete stafülokokkide spetsiifilisi virulentsustegureid ei ole selgelt kindlaks määratud (Huebner ja Goldmann, 1999). Teada on, et osa neist moodustavad seepidiste meditsiiniseadmete pinnale biokilesid – õhukesti kiletaolisi limaga kaetud kolooniaid, mida on substraadilt tunduvalt raskem eemaldada kui üksikuid baktereid. Biokile kaitseb bakterirakke vaenulike välistingimuste eest ja suurendab ühtlasi bakterite resistentsust antibiootikumidele. (Otto, 2013)

Praeguseks on kindlaks määratud üle 40 liigi koagulaas-negatiivseid stafülokokke (Versalovic jt., 2011; viidatud Misawa jt., 2014 järgi).

Staphylococcus epidermidis on inimeste nahal kõige rohkem levinud *Staphylococcus*'e perekonna liik. Bakterit võib leida peaaegu kogu kehapinnal, aga kõige sagedamini koloniseerib ta neid piirkondi, kus on kõrge niiskusesisaldus ja suur toitainete hulk. Sellised

kohad on näiteks ninasõõrmed, kaenlaalused ning kubeme- ja pärakupiirkond. (Schleifer ja Bell, 2009)

Staphylococcus haemolyticus on samuti levinud inimese nahal. Teda on isoleeritud peamiselt kaenlaalustest ja kubemepiirkonnast. See bakter on tugevalt resistentne antibiootikumidele. *S. haemolyticus* võib põhjustada sepsitseemiat, peritoniiti, kõrvapõletikku ja kuseteede põletikku. (Takeuchi jt., 2005)

Staphylococcus hominis on bakteriliik, mida seostatakse inimese endokardiidi, peritoniidi, sepsise ja artriidiga. Teda leidub peamiselt nahal, kus tema arvukus on võrdne *S. epidermidis*'e omaga või sellest pisut väiksem. (Schleifer ja Bell, 2009)

Inimese nahalt on leitud ka liiki *Staphylococcus warneri*, aga põhiliselt esineb see bakter koduloomadel (Schleifer ja Bell, 2009). *S. warneri*'t seostatakse näiteks selgroo lülidevaheliste ketaste infektsiooniga (Announ jt., 2004) ja meningiidiga (Incani jt., 2010).

Staphylococcus capitis esineb sagedamini täiskasvanud inimeste peanahal, aga teda on leitud ka otsmikult, näolt ja kulmude juurest (Schleifer ja Bell, 2009). See bakter on osa inimese tavapärasest mikrofloorast, aga on teada ka juhtum, kus enneaegne vastsündinu on surnud *S. capitis*'e põhjustatud infektsiooni tõttu (Zwet jt., 2002).

Staphylococcus caprae'd on algselt isoleeritud kodukitsede piimast, aga teda esineb vähesel määral ka inimestelt võetud kliinilistes proovides (Schleifer ja Bell, 2009). *S. caprae* võib põhjustada luude ja liigeste infektsioone (Shuttleworth jt., 1997).

Liiki *Staphylococcus saprophyticus* leidub nii inimeste kui ka madalamate imetajate ja lindude organismis, aga peamiselt koloniseerib ta inimese ja teiste imetajate nahka, moodustades väikeseid populatsioone (Schleifer ja Bell, 2009). Ta on sagedane põhjus kuseteede infektsioonide tekke korral (Hovelius ja Mårdh, 1984).

Staphylococcus lugdunensis koloniseerib nahka. See bakter võib tekitada tõsiseid infektsioone, näiteks südameklapi endokardiiti, aga enamasti piirduvad kahjustused nahapõletikega, mis sarnanevad *S. aureus*'e tekitatud infektsioonidega (Böcher jt., 2009). *S. lugdunensis* on β -laktaamantibiootikumidele tundlikum kui enamik teisi koagulaas-negatiivseid stafülokokke (Merck Manual).

Staphylococcus pasteurii, mida leidub samuti inimese organismis, on viimaste aastate jooksul põhjustanud üha rohkem haiglainfektsioone. See bakter saastab näiteks verepreparaate.

(Savini jt., 2009)

1.2. Stafülokokid inimese normaalses mikroflooras

Stafülokokid, eelkõige koagulaas-negatiivsed stafülokokid, kuuluvad inimese naha ja limaskestast normaalsesse mikrofloorasse (von Eiff, 2002). Koagulaas-positiivseid stafülokokke esineb inimese organismis harvem, neist kohtab peamiselt *S. aureus*'t (Misic jt., 2015).

1.2.1. Stafülokokid naha mikroflooras

Koagulaaspositiivseid stafülokokke, eriti *S. aureus*'t, võib leida peamiselt inimeste ja loomade nahalt ning limaskestalt (Misic jt., 2015). *S. aureus*'t kannab umbes 30% inimestest (Asquith ja Harrod, 1979). See bakteriliik koloniseerib tavaliselt ninasõõrmeid ning on arvukam täiskasvanute juures (Schleifer ja Bell, 2009).

Koagulasnegatiivsed stafülokokid on inimese naha tavalised asustajad (von Eiff jt., 2002). Kõige sagedamini esinevateks liikideks on *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* ja *S. hominis* (Schleifer ja Bell, 2009; Takeuchi jt., 2005). Harvem esinevad bakteriliigid on *S. warneri*, *S. capitis* ja *S. auricularis* (Schleifer ja Bell, 2009). Koagulaas-negatiivsed stafülokokid on ühed peamistest bakteritest, kes koloniseerivad vastsündinute ja imikute nahka, moodustades esimestel elukuudel üle 20% kõigist organismis leiduvatest bakteritest. Kuna imiku vanemaks saades stafülokokkide arvukus kahaneb, jäädes esimese eluaasta lõpuks 10% lähedale, on oletatud, et stafülokokid võivad organismi kaitsta, osaledes varajases immuunvastuses, ning nende järk-järguline vähenemine on seotud naha ja immuunsüsteemi arenemisega. (Capone jt., 2011; vt ka Baviera jt., 2014)

Enamasti leidub stafülokokke ninasõõrmetes, kõrvade ümbruses ja kaenlaalustes, kusjuures kõige kõrgem ja stabiilsem on limaskestade kolonisatsioon (Costa jt., 2004).

Keyworthi jt uuringust (Keyworth jt., 1992) on selgunud, et kui vahetult pärast sündi on vastsündinu nahal stafülokokke 0,5 log cfu/cm², siis esimese seitsme elupäeva jooksul kasvab see arv neli korda.

1.2.2. Stafülokokid seedetrakti mikroflooras

Seedetrakti mikrobiota arengut mõjutab imikule antav toit. Esimesed liigid imiku soolestikus on fakultatiivsed anaeroobid. Nad loovad oma tegevusega redutseeritud keskkonna, mis on soodne obligatoorsete anaeroobide jaoks. (Jimenez jt., 2008)

Koagulaas-negatiivsete stafülokokkidega koloniseerub 99% vastsündinutest enamasti kolme esimese elupäeva jooksul. Väljaheites on stafülokokke 8 log cfu/g. Kõige rohkem esineb *S. epidermidis*'t. 3–4 nädala vanuses hakkab stafülokokkide arvukus langema, kahanedes peaaegu poole võrra, kuni kuuenda elukuuni. (Björkqvist jt., 2010; Garcia jt., 2014; Adlerberth jt., 2006)

1.2.3. Stafülokokid rinnapiimas

Rinnapiima peetakse imikute jaoks parimaks toiduks – see sisaldab kõiki toitaineid, mida nad vajavad, ja on lisaks antibakteriaalse toimega (Kayıran jt., 2014). Kui enneaegsetele vastsündinutele hakata varakult rinnapiima andma, väheneb tunduvalt võimalus, et neil tekib nekrotiseeriv enterokoliit – „enneaegsetel vastsündinutel esimestel elunädalatel esinev raske soolepõletik, mis sageli lõpeb soolelõhkemisega“ (Meditisiinisõnastik 2004) – ja lisaks harjuvad nad kiiremini suukaudse toitmisega (Johnston jt., 2012).

Rinnapiimas on prebiootilisi aineid, mis soodustavad mõne bakteriliigi kasvu imiku sooles, ning rinnapiim sisaldab ka ise mikroorganisme, näiteks stafülokokke, streptokokke ja piimhappebaktereid, mis satuvad vastsündinu soolde. Seetõttu on see vastsündinu soolestiku mikrobiota arendamisel väga oluline mõjutaja. (Martín jt., 2003) Kui imikule antakse toiduks rinnapiima, peegeldavad tema soolestikus olevad bakterid piima mikrofloorat (Martín jt., 2007).

Üks võimalus, kuidas mikroorganismid rinnapiima satuvad, on nende edasikandumine imetamise ajal – allikaks on imik ja tema suu mikrofloorasse kuuluvad bakterid kanduvad edasi rinnapiima (Novak jt., 2000). Teine variant on, et ema dendriittrakud püüavad soolestikust baktereid ja kannavad neid kehas laiali, kasutades lümfisüsteemi (Fernández jt., 2012).

Rinnapiimaga toidetud imikute soolestikus on palju rohkem stafülokokke kui nende imikute

soolestikus, kes said toiduks kunstpiimasegu. Stafülokokkidest on peamine liik nii rinnapiimas kui ka piimaga toidetud imikute väljaheites *S. epidermidis*, aga toiduseguga söödud imikute väljaheites esineb seda tunduvalt vähem, peaaegu üldse mitte. Biokilega seotud *icaD* geeni ja *mecA* geeni tuvastati ainult vähestes *S. epidermidise* tüvedes. See lubab oletada, et suured erinevused rinnapiimaga ja kunstpiimaseguga toidetavate imikute soolestiku mikroflooras tulenevad peamiselt rinnapiima ja piimasegu erinevast mikrobioloogilisest koostisest. (Jimenez jt., 2008)

Rinnapiimaga toidetud imikute väljaheide sisaldab aeroobseid baktereid varem kui parenteraalselt toidetud imikute väljaheide ning peamine aeroobne bakter on jälle *S. epidermidis*. (Welsh ja May, 1979)

Eelnevatest uuringutest võib järeldada, et imikute toitmine rinnapiimaga aitab kaasa aeroobsete bakterite arvukuse kasvamisele organismis. Bakterite hulka suurendab ka suukaudne toitmine. Samas ei tähenda see, et kunstpiimaseguga toidetud imikute organismis on üldiselt vähem baktereid. Aeroobsete bakterite asemel koloniseerivad nende seedetrakti teised bakteriliigid. (Jimenez jt., 2008)

1.3. Stafülokokid enneaegsete vastsündinute haigustekitajatena

1.3.1. Stafülokokkide osa hilise sepsise tekkes

Sepsis on süsteemne põletikureaktsioon vastusena bakterite põhjustatud infektsioonile (MedlinePlus).

Vastsündinutel esinevat sepsist jaotatakse varase ja hilise algusega sepsiseks, sõltuvalt selle algusajast. Varase algusega sepsist tekitavad ema suguteedes leiduvad bakterid. Hilise algusega sepsist põhjustavad mikroorganismid pärinevad ümbritsevast keskkonnast. Vastsündinu nakatub hilise algusega sepsisesse tavaliselt enam kui 72 tundi pärast sündi. Kõige rohkem esineb hilise algusega sepsist 10. ja 22. elupäeva vahel. (Dong ja Speer, 2014)

Kuigi edusammud vastsündinute intensiivravis on väga madala sündnakaaluga imikute suremust vähendanud, on hilise algusega sepsis siiski jätkuvalt üks vastsündinute haigestumise ja surma põhjuseid. See on suureks probleemiks peamiselt neile vastsündinutele, kellel on väga madal sündnakaal – väiksem kui 1500 g. Samuti suurendab sepsisesse

nakatumise ohtu enneaegne sünnitus – mida lühem on raseduse kestus, seda suurem on oht sepsise tekkeks. (Stoll jt., 2002)

Hilise algusega sepsise tekkesagedust suurendab ka tsentraalveenikateetri kasutamine ja parenteraalne toitmine. Seega on oluline, et vastsündinu suukaudse toitmisega alustataks varem. (Stoll jt., 2002)

Tüsistused, mida hilise algusega sepsis enneaegsetel vastsündinutel põhjustab, on näiteks bronhopulmonaarne düsplasia ja nekrotiseeriv enterokoliit. Lisaks, kui infektsioonimata vastsündinutest sureb tavaliselt 7%, siis hilise algusega sepsisesse jäänud vastsündinute suremus on 18%. (Stoll jt., 2002)

Enamasti on haigustekitajateks grampositiivsed organismid, kelle osakaal sepsise tekitajate hulgas võib ulatuda isegi 70%-ni. Ligi pooled infektsioonidest on põhjustatud koagulaas-negatiivsete stafülokokkide poolt. (Stoll jt., 2002)

Kõige sagedasemaks nakkusetekitajaks peetakse *S. epidermidis*'t. Klingenbergi jt uuringus (Klingenberg jt., 2005), kus vaadeldi koagulaas-negatiivsete stafülokokkide tekitatud hilise algusega sepsist, põhjustas 72% sepsisejuhtudest *S. epidermidis*. 11% oli sepsise tekke põhjustaja *S. haemolyticus*, 9% *S. warneri*, 6% *S. hominis* ja 2% *S. capitis*.

Viimastel aastatel on tõusnud *S. capitis*'e poolt põhjustatud infektsioonide arv. On täheldatud, et *S. capitis*'e põhjustatud hilise algusega sepsis võib olla isegi tõsisem kui teiste koagulaas-negatiivsete stafülokokkide tekitatud sepsis. (Rasigade jt., 2013)

Koagulaas-positiivsetest stafülokokkidest põhjustab hilise algusega sepsist kõige sagedamini *S. aureus*. Carey jt (2010) on leidnud, et vastsündinute intensiivraviosakonnas on *S. aureus*'e tekitatud infektsioon keskmiselt 15–30 patsiendil tuhande kohta.

Vastsündinute haigestumist hilise algusega sepsisesse aitab vältida rinnapiimaga toitmine, suurendatud tähelepanu hügieenile, naha ja hingamisteede eest hoolitsemine ning diagnostiliste meetodite parandamine. (Stoll jt., 2002)

1.3.2. Hilist sepsist tekitavate tüvede allikas

Üks võimalus stafülokokkide sattumiseks vereringesse on tsentraalveenikateetrite kasutamise kaudu ning seetõttu keskendutakse sepsise ennetustöös peamiselt nahale – enne kateetri

sisestamist puhastatakse nahk antiseptikumi või desinfektandiga (Clark jt., 2004). Samas koloniseerivad koagulaas-negatiivsed stafülokokid sageli ka limaskestast (Costa jt., 2004).

Limaskestadelt, eriti soolestiku limaskestalt isoleeritud stafülokokid on sageli identsed veres leiduvatega. Seetõttu on võimalik, et invasiivsete tüvede allikas on lisaks nahale ka soolestik, ning bakterid imenduvad lümfisõlmede kaudu soolestikust verre. (Costa jt., 2004) Hiljutises uuringus näidati, et 13/22 enneaegsetest vastsündinutest, kellel tekkis hiline koagulaas-negatiivsete stafülokokkide poolt põhjustatud hiline sepsis, oli seedetraktis enne sepsise teket invasiivne tüvi olemas (Soeorg jt., 2013).

1.3.3. Rinnapiimas leiduvad stafülokokid (*S. aureus*) hilise sepsise põhjustajana

Üks peamisi patogeene rinnapiimas, mis põhjustab hilise algusega sepsist, on *S. aureus* (Kawada jt., 2003; Gastelum jt., 2005). Isegi tervete imetavate emade piim, kellel pole rinnapõletikku, võib saada nakkuseallikaks ning eriti suures ohus on enneaegsed vastsündinud (Behari jt., 2004). Nende immuunsüsteem on alles välja kujunemata, immuunvastus organismi sattunud bakteritele ei ole adekvaatne ja seetõttu on nad tundlikumad bakterite põhjustatud kahjustustele (McElroy ja Weitkamp, 2011).

Mitu uuringut on kinnitanud, et stafülokokid levivad imetavalt emalt lapsele. Nad kanduvad edasi nii rinnaga toitmise ajal (Kawada jt., 2003) kui ka varem kogutud ja säilitatud rinnapiima kaudu (Behari jt., 2004; Gastelum jt., 2005). Stafülokokid võivad olla osa piima algupärasest mikrofloorast (Kayıran jt., 2014), aga võimalik on ka, et piim saastub vale kogumistehnika tõttu (Novak jt., 2000).

1.3.4. Kas rinnapiimas leiduvad stafülokokid on vastsündinu jaoks ohutud?

Kuigi stafülokokid on osa organismi mikrofloorast, viitab osa mastiidi ja rinna kroonilise valu kohta tehtud uuringud koagulaas-negatiivsete stafülokokkide võimalikule patogeensele rollile (Delgado jt., 2009). Kõik uuringud ei toeta aga seda arvamust. Witt jt (2014) on leidnud, et koagulaas-negatiivseid stafülokokke ei saa valuga seostada. Rinnavalul võib põhjustada *S. aureus*'e arvukus, aga koagulaas-negatiivsete stafülokokkide hulk ei ole kuidagi seotud kroonilise rinnavaluga või selle puudumisega. Pöördvõrdeline suhe koagulaas-negatiivsete

stafülokokkide ja *S. aureus*'e vahel lubab isegi oletada, et koagulaas-negatiivsed stafülokokid kaitsevad organismi *S. aureus*'e ülemäärase arvukuse eest ning on seetõttu rinnapiimas ohutud bakterid. (Witt jt., 2014)

Rinnapiimas leiduvate koagulaas-negatiivsete stafülokokkide suhtelist ohutust iseloomustab ka asjaolu, et kui vastsündinu suukaudse toitmise varem alustada, väheneb tõenäosus mitmesugustesse haigustesse, sealhulgas hilise algusega sepsisesse haigestumiseks (Stoll jt., 2002). Samas on teada juhtumeid, kus rinnapiimas leidunud *S. aureus* on vastsündinul põhjustanud invasiivse infektsiooni tekke. Näiteks on Gastelum jt (2005) kirjeldanud juhtumit, kus nelikute ema rinnapiimas oli metitsilliin-resistentne *S. aureus*, millega koloniseerusid kõik neli vastsündinut ja millest põhjustatud sepsisesse suri üks nelikutest.

1.4. Haiglas vs kodus levivate stafülokokkide antibiootikumitundlikkus

Stafülokokkide tüved on muutunud antibiootikumide suhtes resistentseks. Kui 20. sajandi keskpaiku oli üle 94% tüvedest penitsilliin-tundlikud, siis praeguseks on 90% tüvedest penitsilliin-resistentsed. (Martins ja Cunha, 2007)

Samuti on kasvanud resistentsus teiste antibiootikumide suhtes. Metitsilliin-resistentsust esineb 31,7% *S. aureus*'e tüvedel ja 67% koagulaas-negatiivsetel stafülokokkidel. Erütromütsiin-resistentsus on vastavalt 31,7% ja 63% ning gentamütsiin-resistentsus 16,9% ja 27,8%. (Cuevas jt., 2004)

1.4.1. Stafülokokkide resistentsus haiglas ja väljaspool haiglat

Stafülokokkide antibiootikumiresistentsus on haiglas viibivate patsientide hulgas tunduvalt suurem kui väljaspool haiglat. Kui haiglavälises keskkonnas esineb metitsilliin-resistentsust vähem kui 40% stafülokokkidest, siis haiglas, patsientide ninasõõrmetest, verest ja teistest kehavedelikest ning tsentraalveenikateetritelt võetud proovides, võib resistentsus ulatuda 87%-ni. (Hira jt., 2007; Du jt., 2013; Ternes jt., 2013)

Haiglas levivate resistentsete bakteritüvedega ei ole koloniseeritud ainult seal viibivad patsiendid, vaid ka tervishoiutöötajad. Du jt (2013) uuringu põhjal on haiglatöötajaid

koloniseerivatest koagulaas-negatiivsete stafülokokkide tüvedest peaaegu pooled metitsilliin-resistentsed (Du jt., 2013). Cimiotti jt (2004) on leidnud, et 95% haiglatöötajatest, kes on pikka aega töötanud vastsündinute intensiivraviosakonnas, on koloniseeritud metitsilliin-resistentsete koagulaas-negatiivsete stafülokokkidega, aga uute töötajate hulgast kandis resistentsid stafülokokke vaid 33% (Cimiotti jt., 2004).

Kõige sagedamini esineb stafülokokkidel resistentsust penitsilliinile ning kliiniliste isolaatide puhul esineb sageli ka resistentsust teistele β -laktaamantibiootikumidele (Du jt., 2013; Ternes jt., 2013). B-laktaamantibiootikumid on antibiootikumiklass, mis on saanud oma nime β -laktaamringi järgi keemilises struktuuris. Nende hulka kuuluvad näiteks penitsilliinid ja tsefalosporiinid ning nad on aktiivsed paljude grampositiivsete, gramnegatiivsete ja anaeroobsete organismide vastu. (Holten ja Onusko., 2000)

Kuna enamik koagulaas-negatiivseid stafülokokke ei allu rutiinsele antibiootikumiravile, mida vastsündinud saavad, kasutatakse alternatiivse meetodina vankomütsiini, sest suur osa stafülokokke on selle suhtes tundlikud (Du jt., 2013; Ternes jt., 2013).

1.4.2. Haiglas viibivate patsientide koloniseerumine resistentsete mikroobidega

Kuna metitsilliin-resistentsete stafülokokkide arvukus haiglas on märgatavalt suurem kui väljaspool haiglat, on täiesti võimalik, et patsiendid koloniseeruvad resistentsete bakteritüvedega haiglas viibides. Seda on kinnitanud näiteks Ternese jt uuring (2013), mille põhjal on vastsündinute organismis haiglasse saabudes keskmiselt 60% *mecA* geeniga stafülokokke. Haiglas viibides võib aga stafülokokkide arvukus, mis kannavad metitsilliin-resistentsust kodeerivat geeni, kasvada peaaegu 84%-ni. Ravimiresistentsete stafülokokkide hulk vastsündinu mikroflooras suureneb intensiivraviosakonnas oldud aja jooksul. (Ternes jt., 2013)

Kõige sagedamini koloniseeruvad resistentsete stafülokokkidega haiglas viibivad vastsündinud, harvem emad ja meditsiinitöötajad. Garcia jt (2014) uuring, kus vaadeldi metitsilliin-resistentset *S. aureus*'t vastsündinute intensiivraviosakonnas, leiti, et resistentsed stafülokokk esines 15% vastsündinutest, 4,7% emadest ja 3,4% haiglatöötajatest. Väljaspool haiglat on metitsilliin-resistentse *S. aureus*'ega koloniseeritud tavaliselt 2–3% rasedaid naisi ja vähem kui 4% imikuid. (Garcia jt., 2014)

1.4.3. Resistentset tüved hospitaliseeritud vastsündinute emade rinnapiimas

Garcia jt (2014) on täheldanud, et kuigi metitsilliin-resistentse *S. aureus*'e ülekanne võib toimuda emalt lapsele, ei ole enamiku juhtude korral emad vastsündinute kolonisatsiooni allikas. Pigem koloniseeruvad emad metitsilliin-resistentsete stafülokokkidega haiglas ja tõenäoliselt on allikaks vastsündinu. (Garcia jt., 2014)

Samas on võimalik resistentsete tüvede ülekandumine emalt lapsele, näiteks rinnapiimaga toitmise kaudu. Piimapankades olevat piima analüüsides on sellest leitud multiresistentseid baktereid, sealhulgas *S. aureus*'t. Enamikul juhtudest ei ole *S. aureus*'e leidumine piimas seotud vale kogumistehnikaga, mille käigus võib piim saastuda naha mikroflooraga. Uurijad on oletanud, et resistentsete bakteritüvede allikas on haigla. Seda arvamust kinnitab resistentse *S. aureus*'e protsendi kõikumine eri piimapankade lõikes, mis võib peegeldada resistentsete stafülokokkide hulka vastava panga juurde kuulavas haiglas. Võimalik, et emad, kes oma rinnapiima piimapanka saadavad, on vastavas haiglas juba varem koloniseerunud. Samuti võivad piima kolonisatsiooni allikaks olla haiglatöötajad. (Novak jt., 2000)

Ema võib resistentse *S. aureus*'ega koloniseeruda näiteks keisrilõike tõttu. Keisrilõike järel viibitakse tavaliselt kauem haiglas kui vaginaalse sünnituse korral ja kasutatakse rohkem antibakteriaalseid aineid. Mõlemad tegurid suurendavad tõenäosust koloniseeruda resistentse stafülokokiga. (Novak jt., 2000)

1.5. Metitsilliin-resistentsus

1.5.1. Resistentsusmehhanism

Stafülokokkide resistentsust kõigi β -laktaamantibiootikumide vastu põhjustab ensüüm penitsillinaas. See ensüüm hüdrolüüsib antibiootikumide β -laktaamringi ning muudab antibiootikumid seeläbi inaktiivseks. (Pantosti jt., 2007) Penitsillinaas asub rakust väljaspool ja seda sünteesivad kromosoomivälised geenid. Neid kannab edasi suur plasmiid, mis sisaldab sageli ka teisi antimikroobseid geene. (Novick ja Bouanchaud, 1971) Praeguseks toodab

penitsillinaasi üle 90% stafülokokkidest (Lowy, 2003).

Stafülokokke muudab metitsilliin-resistentseks täiendav penitsilliini siduv valk (*penicillin-binding protein 2a*, edaspidi PBP2a). β -laktaamantibiootikumide läheduses inaktiveeruvad stafülokokki tavapärased penitsilliini siduvad valgud ja rakuseinu moodustavate peptidoglükaaniahelate süntees on takistatud. PBP2a-d β -laktaamantibiootikumid aga ei takista ning ta on võimeline peptidoglükaani sünteesi üle võtma. (Pantosti jt., 2007)

1.5.2. Erinevate stafülokokkide metitsilliin-resistentsus

Vendemiato jt järgi (2015) on 80% koagulaas-negatiivseid stafülokokke metitsilliin-resistentsed. *S. aureus*'e resistentsus võib olla isegi kuni 51%. Mõlemad bakteriliigid on vastuvõtlikud vankomütsiinile. (Vendemiato jt., 2015)

S. aureus'e resistentsus võib riigiti tugevalt varieeruda. Kui Skandinaaviamaades oli 2008. aasta uuringu järgi resistentseid tüvesid vähem kui 1% ning Eestis 1–5%, siis Kesk-Euroopas ulatus resistentsus 25%-ni ja Lõuna-Euroopas 50%-ni. (EARSS)

Pereira ja da Cunha (2013) uuringu põhjal on vastsündinute verest isoleeritud kogulaasnegatiivsete stafülokokkide hulgas kõige suurem *S. haemolyticus*'e resistentsus – 85,7%. *S. epidermidis*'e metitsilliin-resistentsus on 73,2%, *S. lugdunensis*'e resistentsus 50% ja *S. hominis*'e resistentsus 28,6%. (Pereira ja da Cunha, 2013)

Nijjari jt järgi (2014) on haiglas viibivate patsientide verest võetud proovides *S. epidermidis*'e metitsilliin-resistentsus 91% ning *S. hominis*'e ja *S. haemolyticus*'e resistentsus 90%. *S. capitis*'e tüvedest on resistentsed 56% ja *S. warneri* tüvedest 71%. *S. lentus*'e, *S. lugdunensis*'e, *S. saprophyticus*'e ja *S. simulans*'i metitsilliin-resistentsus oli uuringus 100%, aga nii kõrge resistentsus võib tuleneda ka asjaolust, et igast liigist tuli uuringus ette ainult üks isolaat. (Nijjar jt., 2014)

1.5.3. Metitsilliin-resistentsust kodeerivad geenid

Ravimiresistentsuse kujunemisel mängib tähtsat osa liikuvate geneetiliste elementide perekond, mida nimetatakse stafülokokki kassettkromosoomideks (*staphylococcal cassette chromosomes*, edaspidi SCC) (Du jt., 2013; vt ka Ternes jt., 2013). See sisaldab *mecA* geeni

(SCC*mec*), mis muudab bakteri resistentseks kõigile β -laktaamantibiootikumidele (Marathe jt., 2015). *MecA* geen põhjustab resistentsust, kuna kodeerib PBP2a sünteesi (Nascimento jt., 2015).

SCC*mec*'i muudab liikumisvõimeliseks kohtspetsiifiline kassettkromosoomi rekombinaas (Hall ja Collis, 1995). Praeguseks on leitud 11 tüüpi *S. aureus*'ega seotud kassettkromosoome, mis kannavad *mecA* geeni (Pereira ja da Cunha, 2013).

Metitsilliin-resistentsete stafülokokkide juures esineb kõige rohkem I, II, III ja IV tüüpi SCC*mec* (Pereira ja da Cunha, 2013). Kõige suuremat resistentsete geenide hulka kannab tüüp III, mida seostatakse tõsiste haiglainfektsioonidega (Ito jt., 1999).

1.5.4. Resistentsuse levik ja koagulaas-negatiivsete stafülokokkide tähtsus selles

Erinevad stafülokokkide liigid kannavad väga sarnaseid SCC*mec* elemente, mis tähendab, et SCC võivad levida ühelt stafülokoki liigilt teisele ja kanda seejuures edasi resistentseid geene. Smyth jt (2011), kes uurisid SCC*mec* tüübi IV alatüüpide levikut *S. aureus*'e ja koagulaas-negatiivsete stafülokokkide hulgas, leidsid, et kuigi ühised alatüübid moodustasid ainult 17% kõigist võimalikest SCC*mec* IV alatüüpidest, olid need levinud 67% isolaatide juures. Kuna tüüp IV on üks lühemaid SCC*mec* tüüpe, on see teistest võrdlemisi liikuvam ja võib seetõttu kergemini ühelt stafülokoki liigilt teisele kanduda. (Smyth jt., 2011)

SCC*mec* elemendid on koagulaas-negatiivsete stafülokokkide hulgas üsna laialt levinud ja kui tekivad uued resistentid *S. aureus*'e kloonid, peetakse koagulaas-negatiivseid stafülokokke potentsiaalseteks SCC*mec* doonoriteks. (Berglund ja Söderquist, 2008)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Enneaegsed vastsündinud ja nende emad veedavad haiglas kauem aega ja tarvitavad suurema tõenäosusega antibiootikume kui ajalised vastsündinud oma emadega, seetõttu on võimalik, et enneaegsete vastsündinute emad koloniseeruvad haiglas metitsilliin-resistentsete stafülokokkidega ja nende rinnapiim sisaldab rohkem resistentseid bakteritüvesid. Sellest tulenevalt on käesoleva töö eesmärgiks võrrelda metitsilliin-resistentsust kodeeriva geeni olemasolu tervete ajaliste ja intensiivraviosakonda hospitaliseeritud enneaegsete vastsündinute emade rinnapiimas leiduvatel mitte-*S. epidermidis* liiki kuuluvatel stafülokkidel.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Uuritavad

Uuritavateks on rinnapiimatoidul olevad vastsündinud ja nende emad. Mitmikute puhul on uuringusse kaasatud ema ja esimesena sündinud vastsündinu. Uuritavate kaasamine uuringusse algas jaanuaris 2014. aastal ja kestab senini. Plaanitav uuritavate ema ja vastsündinu paaride arv on 70. Käesolevas uurimistöös on neist uuritud 55 paari.

Uuritavad jaotuvad nelja gruppi. Esimese grupi (grupp A) moodustavad 20 ema ja enneaegse vastsündinu paari SA Tallinna Lastehaigla anesthesioloogia ja intensiivravi osakonnast (käesolevas töös on vaadeldud neist 8 paari) ning teise grupi (grupp B) 20 ema ja enneaegse vastsündinu paari SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Anesthesioloogia ja intensiivravi kliiniku lasteintensiivravi osakonnast (käesolevas töös on vaadeldud 17 paari). Vastsündinu on enneaegseks loetud siis, kui tema gestatsioonivanus on väiksem kui 32 nädalat.

Uuringusse kaasamise kriteeriumiteks olid gestatsioonivanus vähem kui 32 nädalat ja allkirjastatud informeeritud nõusolek emalt. Vastsündinu pidi olema esimese elunädala jooksul hospitaliseeritud SA Tallinna Lastehaigla või SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Anesthesioloogia ja intensiivravi kliiniku lasteintensiivravi osakonda. Eeldatav ema pastöriseerimata rinnapiimaga toitmise alustamise aeg pidi olema esimese elunädala jooksul

pärast sündi.

Uuringust väljaarvamise kriteeriumid olid emapoolse allkirjastatud informeeritud nõusoleku puudumine, vastunäidustused rinnapiimaga toitmisele ja prognoositav eluiga 72 tundi või lühem.

Kolmandas grupis (grupp C) on 10 ema ja peaaegu ajalise vastsündinu paari, kes on kaasatud nii SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Anestesioloogia ja intensiivravi kliiniku lasteintensiivravi osakonnast. Vastsündinute gestatsioonivanus antud grupis jääb 32 ja 36 nädala vahele.

Selle grupi uuringusse kaasamise kriteeriumiteks olid 32–36 nädala pikkune gestatsioonivanus ja allkirjastatud informeeritud nõusolek emalt. Vastsündinu pidi olema esimese elunädala jooksul hospitaliseeritud SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Anestesioloogia ja intensiivravi kliiniku lasteintensiivravi osakonda. Eeldatav aeg, millal vastsündinu hakkab saama toiduks oma ema pastöriseerimata rinnapiima, pidi olema esimese elunädala jooksul pärast sündi.

Uuringust väljaarvamise kriteeriumid olid emapoolse allkirjastatud informeeritud nõusoleku puudumine, vastunäidustused rinnapiimaga toitmisele ja prognoositav eluiga 72 tundi või lühem.

Neljandasse gruppi (grupp D) kuulub 20 ema ja ajalise vastsündinu paari SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Lastekliiniku neonatoloogia osakonna naistekliiniku filiaalist. Vastsündinute gestatsioonivanus on 37 nädalat või enam ja sünnikaal vähemalt 2500 grammi.

Ajaliste vastsündinute puhul olid uuringusse kaasamise kriteeriumiteks vähemalt 37 nädala pikkune gestatsioonivanus ja sünnikaal vähemalt 2500 grammi. Tingimuste hulgas olid ka allkirjastatud informeeritud nõusolek emalt, ema ja vastsündinu pidid olema terved ning vastsündinu pidi olema ainult rinnapiimatoidul.

Uuringust väljaarvamise kriteeriumid olid emapoolse allkirjastatud informeeritud nõusoleku puudumine ja vastunäidustused rinnapiimaga toitmisele. Lisaks jäeti vastsündinu ja ema uuringust kõrvale sellisel juhul, kui emale oli antibiootikume manustatud kolme kuu jooksul enne sünnitust või sünnituse ajal, ning siis, kui emale või lapsele oli antibiootikume manustatud ühe kuu jooksul pärast sünnitust.

2.2.2. Proovide kogumine ja säilitamine

Käesoleva töö uurimisobjektiks on uuringus osalevate emade rinnapiim. Uuritavatelt korjati proove kord nädalas, esmaspäeviti. Proovide kogumisel võis esineda ± 1 -päevane kõikumine.

Rinnapiima kogumiseks pesi ema rinnad seebi ja veega ning puhastas seejärel desinfitseerimisvahendiga. Piima ekspressioon toimus manuaalselt ning pärast esimeste tilkade suunamist mujale koguti 3 milliliitrit rinnapiima steriilsesse konteinerisse.

Proove säilitati haiglas $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures mitte kauem kui 96 tundi. Seejärel transporditi proovid Tartu Ülikooli mikrobioloogia instituuti, kus säilitati neid edasi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Külvamiseks kasutati stafülokokkidele selektiivset söödet, soola mannitool agarit. Pärast külvamist inkubeeriti proove 48 tundi $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Ühest materjalist isoleeriti viis kolooniat, seejuures iga morfoloogiliselt erinev koloonia.

2.2.3. Liigi tasemele identifitseerimine

Stafülokokkide isolaatide lõplik identifitseerimine liigi tasemele toimus MALDI-TOF MS abil (MALDI – maatriksainega vahendatud laser-ioniseerimine ja desorptsioon, ingl. *matrix-assisted laser desorption/ionization*; TOF MS – lennuaja mass-spektromeeter, ingl. *time-of-flight mass spectrometer*). Isolaate säilitati *skim milk* söötmes $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures.

2.2.4. DNA eraldamine

Uuritavate stafülokokkide DNA eraldati keetmise teel. 0,2-milliliitristesse tuubidesse pipeteeriti 100 μL nukleaaasivaba vett ja bakterikolooniad asetati sellesse 1 μL külviaasa otsaga. Tuube bakteritega kuumutati 15 minutit $+98\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures, PCR masinas. Seejärel tsentrifuugiti segu viis minutit, sagedusel 14 500 rpm. Lõpuks eraldati 80 μL supernatanti, mis asetati 0,2-milliliitrisesse mikrotuubi ja mida säilitati $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures.

2.2.5. PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)

Selleks, et tuvastada metitsilliin-resistentsuse eest vastutava *mecA* geeni olemasolu stafülokokkides, on kasutatud PCR-i. *MecA* geeni amplifitseerimisel oli matriitsiks

enneaegsete ja ajaliste vastsündinute emade rinnapiimast eraldatud stafülokokkide DNA. Kasutatud praimerid, M1 ja M2 (tabel 2), amplifitseerisid *mecA* geeni 310-bp fragmenti (Vannuffel jt., 1995).

PCR reaktsioonisegu üldmaht ühe proovi jaoks oli 25 µl. Segu koostis on järgnevas tabelis (tabel 1).

Tabel 1. Stafülokokkide *mecA* geeni PCR. (Vannuffel jt., 1995 järgi)

	Lõppkontsentratsioon	1 reaktsioon (µl)
nukleasivaba H ₂ O		13,375
Mg ₂ ⁺ (25 mM)	1,5 mM	1,5
dNTP (2,5 mM)	0,25 mM	2,5
praimer M1 (20 µl)	1 µM	1,25
praimer M2 (20 µl)	1 µM	1,25
puhver ammooniumsulfaat (10x)	1x	2,5
Taq polümeraas (50U/µl)	1,25 U	0,125
DNA		2,5

MecA geeni PCR reaktsiooni etapid:

- 1) 92 °C 1 min
- 2) 92 °C 1 min
- 3) 56 °C 1 min
- 4) 72 °C 1 min
- 5) 72 °C 3 min

Tsüklite arv 30 (2.–4. etapp).

Tabel 2. Kasutatud praimerid. (Vannuffel jt., 1995 järgi)

Nimi	Järjestus
M1	5' TGGCTATCGTGTCAACAATCG
M2	5' CTGGAACCTTGTTGAGCAGAG

2.2.6. DNA geelelektroforees

MecA geeni (produkt 310 bp) olemasolu kontrolliti geelelektroforeesil. Selleks võeti 15 µl PCR reaktsioonisegu ja lisati 4 µl markervärvi (0,03% broomfenoolsinist, 0,03% ksüleentsüanool FF-i, 60% glütserooli (Lifetechnologies)). Proov kanti horisontaalsele etiidiumbromiidi sisaldavale (0,15 µg/ml) 0,8%-sele agarosgeelile 1xTAE puhvril (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8,0 (Sambrook jt., 1989)). Elektroforees tehti pingel 150 volti.

2.3. Tulemused

Uuringu käigus analüüsitud proovidest tuvastati 181 stafülokokki. Arvukuse alusel reastuvad stafülokokid järgnevalt: *S. haemolyticus* – 46 isolaati; *S. hominis* – 43 isolaati; *S. lugdunensis* – 27 isolaati; *S. warneri* – 26 isolaati; *S. aureus* – 25 isolaati; *S. capitis* – 7 isolaati; *S. pasteurii* – 5 isolaati; *S. saprophyticus* ja *S. caprae* – kumbagi 1 isolaat.

Metitsilliin-resistentseid tüvesid leidis ainult *S. haemolyticus*'e ja *S. hominis*'e isolaatide hulgas. *S. haemolyticus*'e isolaatidest kandis *mecA* geeni 29 isolaati (63,0%) ja *S. hominis*'e isolaatide hulgast 11 isolaati (25,6%).

Esimesse uuritavate gruppi kuulusid emad oma enneaegsete vastsündinutega, kes olid hospitaliseeritud SA Tallinna Lastehaigla (edaspidi grupp A) või SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Anestesioloogia ja intensiivravi kliiniku lasteintensiivravi osakonda (edaspidi grupp B). Sellest grupist võetud proovides esines 54 stafülokokki, neist 28 grupi A proovides ja 26 grupi B proovides. Täpsemad andmed stafülokokkide kohta uuringugruppide lõikes on tabelis 3.

Grupi A proovides oli 14 metitsilliin-resistentset stafülokokki – 11 *S. haemolyticus*'t ja 3 *S. hominis*'t. Kokku moodustasid metitsilliin-resistentsed stafülokokid 50% isolaatidest. Uuringugruppi kuuluvast kaheksast emast oli resistentsete stafülokokkidega koloniseeritud viis. Neist neli kandis ainult metitsilliin-resistentset *S. haemolyticus*'t ning üks nii resistentset *S. haemolyticus*'t kui ka resistentset *S. hominis*'t, seega koloniseeris *S. haemolyticus* 62,5% emadest ja *S. hominis* 12,5% emadest.

Grupi B proovides oli metitsilliin-resistentset *S. haemolyticus*'t 7 ja metitsilliin-resistentset *S.*

hominis't 1. Kokku oli resistentseid stafülokokke 30,8% isolaatidest. Uuringugruppi kuuluvast 17 emast oli resistentsete stafülokokkidega koloniseeritud kuus. Neist viis kandis resistentset *S. haemolyticus*'t (29,4%) ja üks resistentset *S. hominis*'t (5,9%). Andmed stafülokokkide resistentsuse kohta uuringugruppide kaupa on tabelis 4 ja andmed resistentsete stafülokokkidega koloniseeritud emade kohta joonisel 1.

Teise grupi (edaspidi grupp C) moodustasid ema ja hilise enneaegse vastsündinu paarid SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Anestesioloogia ja intensiivravi kliiniku lasteintensiivravi osakonnast. Sellesse gruppi kuuluvatelt emadelt võetud proovides leidis 24 stafülokokki (tabel 3). Neist 9 olid metitsilliin-resistentsed *S. haemolyticus*'e tüved ja 5 metitsilliin-resistentsed *S. hominis*'e tüved (tabel 4). Kokku oli resistentseid stafülokokke 58,3% isolaatidest. Kümnest emast oli koloniseeritud viis, neist üks ainult resistentse *S. haemolyticus*'ega, üks resistentse *S. hominis*'ega ning kolm nii resistentse *S. haemolyticus* kui ka *S. hominis*'ega. Seega koloniseerisid nii metitsilliin-resistentne *S. haemolyticus* kui ka *S. hominis* 40,0% emadest (joonis 1).

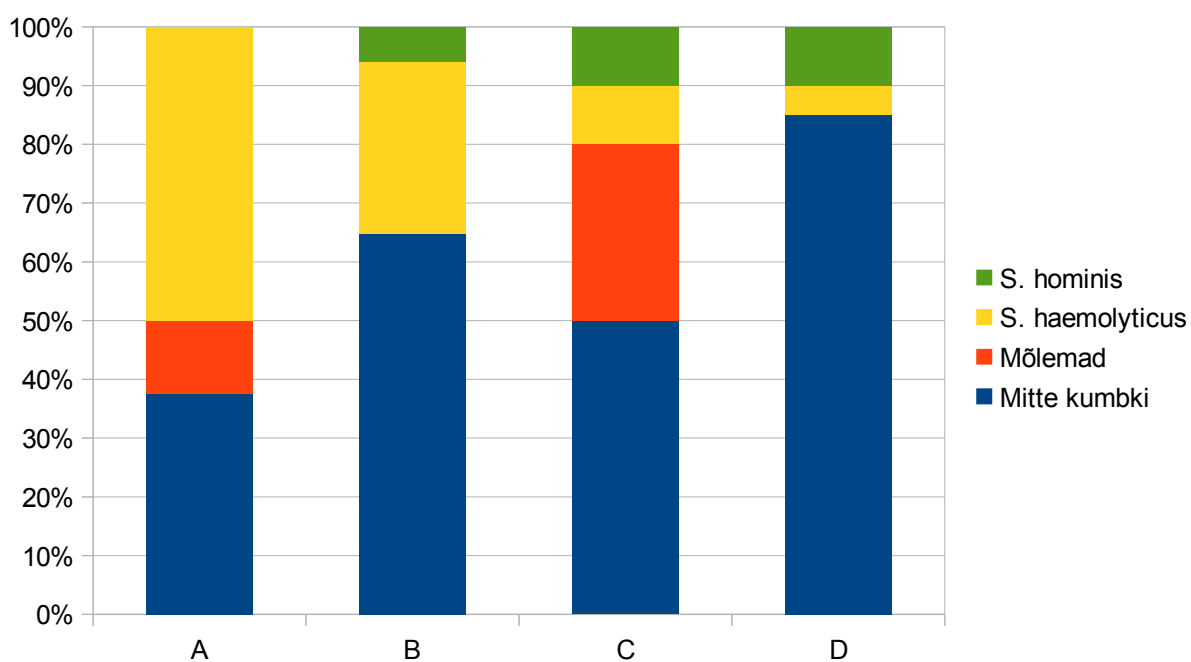
Kolmas grupp (edaspidi grupp D) koosnes emadest ja ajalistest vastsündinutest, kes olid kaasatud SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Lastekliiniku neonatoloogia osakonna naistekliiniku filiaalist. Sellelt grupilt võetud proovides oli 103 stafülokokki (tabel 3), neist 2 metitsilliin-resistentse *S. haemolyticus*'e tüved ja 2 metitsilliin-resistentse *S. hominis*'e tüved (tabel 4). Kokku moodustasid resistentseid stafülokokke 3,9% isolaatidest. Gruppi kuuluvast 20 emast oli resistentsete stafülokokkidega koloniseeritud kolm. Neist kaks kandis metitsilliin-resistentset *S. hominis*'t (10,0%) ja üks metitsilliin-resistentset *S. haemolyticus*'t (5,0%) (joonis 1).

Tabel 3. Isolaatide arv uuringugruppide lõikes.

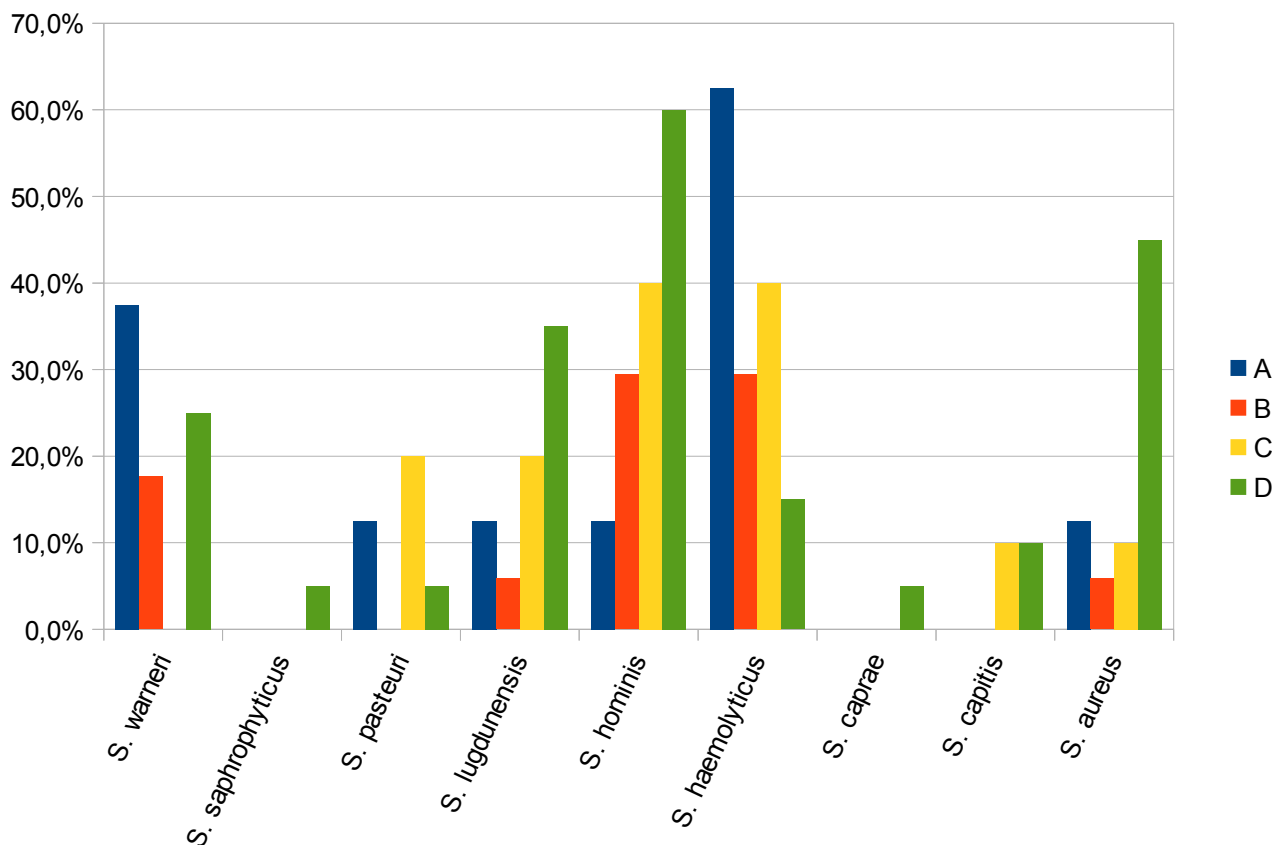
	Grupp A	Grupp B	Grupp C	Grupp D	KOKKU
<i>S. haemolyticus</i>	11	7	9	19	46
<i>S. hominis</i>	4	10	6	23	43
<i>S. lugdunensis</i>	4	3	3	17	27
<i>S. warneri</i>	6	5		15	26
<i>S. aureus</i>	2	1	2	20	25
<i>S. capitis</i>			1	6	7
<i>S. pasteurii</i>	1		3	1	5
<i>S. caprae</i>				1	1
<i>S. saprophyticus</i>				1	1
KOKKU	28	26	24	103	

Tabel 4. Metitsilliin-resistentsete isolaatide arv uuringugruppide lõikes.

	Grupp A	Grupp B	Grupp C	Grupp D	KOKKU
<i>S. haemolyticus</i>	11	7	9	2	29
<i>S. hominis</i>	3	1	5	2	11
KOKKU	14	8	14	4	
MR isolaatide %	50,00%	30,77%	58,33%	3,88%	



Joonis 1. Metitsilliin-resistentsete stafülokokkidega koloniseeritud emade protsent uuringugruppide lõikes.



Joonis 2. Emade koloniseerumine erinevate stafülokokiliikide kaupa. (Eri värvid tähistavad erinevaid uuringugruppe; protsendid näitavad, mitu protsenti igasse uuringugruppi kuuluvatest emadest oli vastava stafülokokiga koloniseeritud.)

2.4. Arutelu

Käesolevas uurimistöös on vaadeldud metitsilliin-resistentsete stafülokokkide esinemist enneaegsete ja ajaliste vastsündinute emade rinnapiimas. Tulemustest selgub, et resistentsete stafülokokkidega on koloniseeritud märgatavalt rohkem enneaegsete kui ajaliste vastsündinute emasid. Kõik enneaegsed ja peaaegu ajalised vastsündinud olid esimese elunädala jooksul hospitaliseeritud lasteintensiivravi osakonda. Mitu uuringut on näidanud, et haiglas viibivatelt patsientidelt võetud proovides on metitsilliin-resistentseid stafülokokke tunduvalt rohkem kui haiglavälises keskkonnas ja resistentsete stafülokokkide arvukus patsiendi organismis kasvab haiglas oldud aja jooksul (Hira jt., 2007; Du jt., 2013; Ternes jt., 2013). Seega on võimalik, et ema koloniseerus resistentsete stafülokokkidega sel ajal, kui ta koos vastsündinuga haiglas oli.

Võimalust, et rinnapiima mikrofloora kujuneb vastavalt haiglas esinevatele bakteritele, kinnitab ka fakt, et tervete ajaliste vastsündinute emade rinnapiimas oli eri stafülokokiliike rohkem kui hospitaliseeritud vastsündinute emade rinnapiimas. Varasemast on teada, et bakteripopulatsioon väljaspool haiglat on palju mitmekesisem kui haiglas (Du jt., 2013) ning stafülokokiliikide arvukuse kõikumine erinevatelt uuringugruppidelt võetud proovides osutab keskkonna tähtsusele piima mikrofloora kujundamisel.

Lisaks mõjutab stafülokokkide resistentsust antibiootikumide kasutamine. 35-st enneaegse vastsündinu emast oli 26 tarvitanud β -laktaamantibiootikume (peamiselt penitsilliini või tsefuroksiimi) kolm kuud enne sünnitust, sünnituse ajal või üks kuu pärast sünnitust. Uuringusse kaasatud ajaliste vastsündinute emad ei olnud sama aja jooksul aga üldse antibiootikume tarvitanud. Antibiootikumiravi hävitab ravimitele tundlikud mikroorganismid (Ternes jt., 2013), mis võib olla üheks põhjuseks, miks oli nii bakteriliikide kui ka isolaatide arvukus enneaegsete vastsündinute emadelt võetud proovides väiksem kui ajaliste vastsündinute emadelt võetud proovides (joonis 2). Väiksema konkurentsi tõttu on aga resistentsetele bakteritele loodud paremad elutingimused (Ternes jt., 2013).

Kõige rohkem esines uuritavates rinnapiimaproovides *S. haemolyticus*'e ja *S. hominis*'e isolaate. *S. haemolyticus*'ega oli koloniseeritud 17 ema ja *S. hominis*'ega 22 ema ning need stafülokokid olid ka ainsad uuringus ette tulnud bakteriliigid, kelle isolaatide hulgas leidis resistentseid tüvesid. *S. haemolyticus* ja *S. hominis* on inimese nahal väga levinud ning moodustavad osa tavapärasest mikrofloorast (Takeuchi jt., 2005; Schleifer ja Bell, 2009). Nende stafülokokkide kõrge resistentsus vastab varasematele uuringutele (Pereira ja da Cunha, 2013; Nijjari jt., 2014), kus need kaks bakteriliiki, eriti *S. haemolyticus*, on välja toodud kui ühed resistentsaimad.

Proovides oli arvukuselt kolmas stafülokokk *S. lugdunensis* – bakter, mis tekitab sageli nahainfektsioone, aga palju harvem tõsisemaid haigusi ning on osa naha tavapärasest mikrofloorast (Böcher jt., 2009). Ka seda bakterit leidis kõige rohkem tervete ajaliste vastsündinute emade rinnapiimas. *S. lugdunensis*'ega koloniseeritud emasid oli 11.

S. warneri suur arvukus tervete ajaliste vastsündinute emade rinnapiimas ja vähene esinemine hospitaliseeritud enneaegsete vastsündinute emade rinnapiimas on seletatav asjaoluga, et see bakter koloniseerib peamiselt koduloomi (Schleifer ja Bell, 2009) ning seetõttu leidub teda väliskeskkonnast puhtamas haiglakeskkonnas harva. *S. warneri* on naha tavaline kommensaal, mis ohustab peamiselt nõrga immuunsüsteemiga inimesi (Announ jt., 2004). Uuritavate

emade hulgas koloniseeris see bakter 11 ema.

Kuigi *S. aureus*'e isolaate oli kokku tervelt 25 ja sellega oli koloniseeritud 12 ema, ei leidunud üheski proovis metitsilliin-resistentset *S. aureus*'t. Resistentse *S. aureus*'e puudumine vastab EARSS-i (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) andmetele, mille põhjal on *S. aureus*'e resistentseid tüvesid Eestis väga vähe, 2008. aasta andmete põhjal ainult 1–5% (EARSS).

Lisaks selgub eri uuringugruppe võrreldes, et enneaegsete vastsündinute emade rinnapiimas oli *S. aureus*'e isolaate mitu korda vähem kui ajaliste vastsündinute emade rinnapiimas ning ka koloniseeritud emade arv oli tunduvalt väiksem. Erinevalt koagulaas-negatiivsetest stafülokokkidest, mis kuuluvad inimese naha ja limaskestade normaalsesse mikrofloorasse (von Eiff, 2002) ning millega 99% vastsündinuid koloniseerub kolme esimese elupäeva jooksul (Björkqvist jt., 2010; Garcia jt., 2014), on koagulaas-positiivsed liigid tunduvalt virulentsemad (Schleifer ja Bell, 2009) ja *S. aureus* on üks sagedasemaid hilise algusega sepsise põhjustajaid (Carey jt., 2010). Metitsilliin-tundliku *S. aureus*'e vähesus enneaegsete vastsündinute emade rinnapiimas on seletatav antibiootikumiraviga, mis võib mikrofloorast elimineerida tundlikud bakterid (Ternes jt., 2013).

Stafülokokkide *S. capitis* ja *S. pasteurii* isolaate leidis nii haiglas kui ka väljaspool haiglat vähe – *S. capitis*'ega koloniseeritud emasid oli kolm ja *S. pasteurii*'ga koloniseeritud emasid neli. Mõlemad bakteriliigid on osa inimese mikrofloorast (Schleifer ja Bell, 2009), aga viimastel aastatel on neid üha sagedamini infektsioonidega seostatud. *S. capitis*'e põhjustatud sepsist peetakse teiste koagulaas-negatiivsete stafülokokkide tekitatust palju tõsisemaks (Rasigade jt., 2013) ja *S. pasteurii* on viimaste aastate jooksul põhjustanud üha enam haiglainfektsioone (Savini jt., 2009). Samas ei olnud uuringu käigus tuvastatud isolaatide näol tegu metitsilliin-resistentsete tüvedega.

Nii *S. caprae*'d kui ka *S. saprophyticus*'t oli uuritavates proovides ainult üks. Mõlemad isolaadid pärinesid tervete ajaliste vastsündinute emadelt võetud proovidest. Nende bakterite vähene esinemine vastab varasematele uuringutele, mille põhjal leidub *S. caprae*'d ja *S. saprophyticus*'t inimeste juures harva ja väikeste populatsioonidena (Schleifer ja Bell, 2009). Kumbki bakter ei tekita tavaliselt tõsiseid infektsioone (Hovelius ja Mårdh, 1984; Shuttleworth jt., 1997).

KOKKUVÕTE

Stafülokokid on grampositiivsed bakterid ja oportunistlikud patogeenid, kelle sattumine verre võib põhjustada tõsist infektsiooni. Eriti suures ohus on enneaegsed vastsündinud, kuna nende immuunsüsteem on alles välja kujunemata ja immuunvastus organismi sattunud bakteritele pole adekvaatne. Stafülokokid on ühed peamised hilise algusega sepsise tekitajaid. Hilise algusega sepsisesse sureb 18% haigestunud vastsündinutest.

Kuna haiglas levib resistentseid stafülokokke mitu korda rohkem kui väljaspool haiglat, on võimalik, et haiglaga kokku puutuvad inimesed koloniseeruvad resistentsete tüvedega. Käesolevas töös on uuritud metitsilliin-resistentsust kodeeriva *mecA* geeni olemasolu rinnapiimas leiduvatel stafülokokkidel ning võrreldud tervete ajaliste ja intensiivraviosakonda hospitaliseeritud enneaegsete vastsündinute emade rinnapiima.

Uuritavateks olid 55 ema ja vastsündinu paari ning uurimisobjektiks uuringus osalevate emade rinnapiim. Proovid külvati soola mannitool agarile, mis on stafülokokkidele selektiivne sööde. Stafülokokid identifitseeriti liigi tasemele MALDI-TOF MS abil, nende DNA eraldati keetmise teel ja *mecA* geeni olemasolu tuvastamiseks kasutati PCR ahelreaktsiooni. *MecA* geeni olemasolu kontrolliti geelelektroforeesil.

Analüüsitud proovidest tuvastati 181 stafülokokki. Neist olid metitsilliin-resistentsed 29 *S. haemolyticus*'e isolaati ja 11 *S. hominis*'e isolaati. Pääagu kõik metitsilliin-resistentsed stafülokokid esinesid hospitaliseeritud vastsündinute emade rinnapiimas. Tervete ajaliste vastsündinute emade rinnapiimas oli ainult kaks resistentset *S. haemolyticus*'e ja kaks resistentset *S. hominis*'e isolaati. Seega võib järeldada, et ema koloniseerus resistentsete stafülokokkidega haiglas viibides.

Kuigi enneaegsete vastsündinute emade rinnapiimas esines metitsilliin-resistentseid stafülokokke sagedamini, oli nende rinnapiima koostis liigiliselt vaesem kui ajaliste vastsündinute emade oma. Seda saab selgitada antibiootikumiraviga, mis vähendab antibiootikumitundlike mikroorganismide arvukust. Enneaegsete vastsündinute emade pikaajaline kokkupuude haiglaga soodustab omakorda emade koloniseerumist haiglas levivate resistentsete tüvedega.

METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI IN BREAST MILK OF MOTHERS OF PRETERM AND TERM NEONATES

Magda Karakai

Summary

Staphylococci are gram-positive bacteria and opportunistic pathogens, who can cause serious infections. Preterm neonates are at high risk, because their immune system is still undeveloped and immune response to the bacteria in their organism is inadequate. Staphylococci are one of the most frequent cause of neonatal late-onset sepsis that is still a cause of illness and death of preterm neonates, despite the latest developments in medicine. Especially harmful is sepsis caused by the antibiotic-resistant staphylococci.

The antibiotic resistance of staphylococci is caused by the *mecA* gene that makes bacteria resistant to all the β -lactam antibiotics. Antibiotic resistance staphylococci are more common in hospital and that allows us to suppose that neonates and mothers are colonised with resistant staphylococci during the time they are hospitalised. The aim of this thesis was to study the presence of *mecA* gene in staphylococci that can be found in breast milk. The results of the mothers of hospitalised preterm neonates were compared to the results of the mothers of healthy term neonates.

55 pairs of mother and neonate were participating in the study. The object of the study was mothers' breast milk. Samples were planted to the mannitol salt agar, staphylococci-selective culture medium. Bacteria were identified by the MALDI-TOF MS, their DNA was separated and *mecA* gene was detected with PCR. The presence of *mecA* was controlled with gel electrophoresis.

There were 181 staphylococci in analysed samples. 29 isolates of *S. haemolyticus* and 11 isolates of *S. hominis* were methicillin-resistant. Almost all of the resistant staphylococci were in the breast milk of the mothers of hospitalised neonates. In the breast milk of the mothers of healthy neonates were only two resistant *S. haemolyticus* isolates and two *S. hominis* isolates. Therefore it can be supposed that mothers were colonised with staphylococci during their time of being hospitalised.

At the same time there were less staphylococcus species in breast milk of the mothers of

preterm neonates. It can be explained with antibiotic treatment that reduces the number of antibiotic-susceptible micro-organisms. Long contact with hospital in turn promotes the colonisation of hospital-borne resistant strains.

KIRJANDUS

Adlerberth, I., Lindberg, E., Åberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I.-L. and Wold, A. E. (2006). Reduced Enterobacterial and Increased Staphylococcal Colonization of the Infantile Bowel: An Effect of Hygienic Lifestyle? *Pediatric Research*. 59: 96–101.

Ahrné, S., Lönnermark, E., Wold, A. E., Åberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I.-L., Molin, G. and Adlerberth, I. (2005). Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes Infect*. 7: 1256–1262.

Announ, N., Mattei, J., Jaoua, S., Fenollar, F., Sati, H., Chagnaud, C., Roudier, J. and Guis, S. (2004). Multifocal discitis caused by *Staphylococcus warneri*. *Joint Bone Spine* 71: 240–242.

Asquith, M. T. and Harrod, J. R. (1979). Reduction of bacterial contamination in banked human milk. *Journal of Pediatrics*. 95: 993-994.

Behari, P., Englung, J., Alcasid, G., Garcia-Houchins, S. and Weber, S. G. (2004). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to preterm infants through breast milk. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 25: 778–780.

Berglund, C. and Söderquist, B. (2008). The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden—possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 14: 1048–1056.

Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*. 181: 4725–4733.

Björkqvist, M., Liljedahl, M., Zimmermann, J., Schollin, J. and Söderquist, B. (2010). Colonization pattern of coagulase-negative staphylococci in preterm neonates and the relation to bacteremia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 29: 1085–1093.

Böcher, S., Tønning, B., Skov, R. L. and Prag, J. (2009). *Staphylococcus lugdunensis*, a common cause of skin and soft tissue infections in the community. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 946–950.

Capone, K. A., Dowd, S. E., Stamatas, G. N. and Nikolovski, J. (2011). Diversity of the

human skin microbiome early in life. *Journal of Investigative Dermatology*. 131: 2026–2032.

Carey, A. J., Duchon, J., Della-Latta, P. and Saiman, L. (2010). The epidemiology of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit, 2000-2007. *Journal of Perinatology*. 30: 135–139.

Cimiotti, J. P., Wu, F., Della-Latta, P., Nesin, M. and Larson, E. (2004). Emergence of Resistant Staphylococci on the Hands of New Graduate Nurses. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 25: 431–435.

Clark, R., Powers, R., White, R., Bloom, B., Sanchez, P. and Benjamin Jr, D. K. (2004). Nosocomial Infection in the NICU: A Medical Complication or Unavoidable Problem? *Journal of Perinatology*. 24: 382–388.

Costa, S. F., Miceli, M. H. and Anaissie, E. J. (2004). Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *The Lancet Infectious Diseases*. 4: 278–286.

Cuevas, O., Cercenado, E., Vindel, A., Guinea, J., Sánchez-Conde, M., Sánchez-Somolinos, M. and Bouza, E. (2004). Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48: 4240–4245.

Eiff, C. von, Peters, G. and Heilmann, C. (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases*. 2: 677–685.

El-Mohandes, A. E., Keiser, J. F., Johnson, L. A., Refat, M. and Jackson, B. J. (1993). Aerobes isolated in fecal microflora of infants in the intensive care nursery: relationship to human milk use and systemic sepsis. *American Journal of Infection Control*. 21: 231–234.

Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R. and Rodríguez, J. M. (2012). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*. 69: 1–10.

Garcia, C. P., Rosa, J. F., Cursino, M. A., Lobo, R. D., Mollaco, C. H., Gobara, S., Malieno, P. B., Raymundo, G. F., Soares, R. E., Keil, K. G., Toma, E., Salomão, M. C., Matté, M. H., Krebs, V. L., Gibelli, M. A., Kondo, M. M., Zugaib, M., Costa, S. F. and Levin, A. S. (2014). Non-multidrug-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 33: 252–259.

Gastelum, D. T., Dassey, D., Mascola, L. and Yasuda, L. M. (2005). Transmission of

community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from breast milk in the neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24: 1122–1124.

Hall, R. M. and Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*. 15: 593–600.

Harpin, V. A. and Rutter, N. (1993). Barrier properties of the newborn infant's skin. *J. Pediatr.* 102: 419–425.

Hira, V., Sluijter, M., Estevão, S., Horst-Kreft, D., Ott, A., Groot, R. de, Hermans, P. W. M. and Kornelisse, R. F. (2007). Clinical and molecular epidemiologic characteristics of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infections in intensive care neonates. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 26: 607–612.

Holten, K. B. and Onusko, E. M. (2000). Appropriate Prescribing of Oral Beta-Lactam Antibiotics. *American Family Physician*. 62: 611–620.

Hovelius, B. and Mårdh, P.-A. (1984). *Staphylococcus saprophyticus* as a common cause of urinary tract infections. *Clinical Infectious Diseases*. 6: 328–337.

Huebner, J. and Goldmann, D. A. (1999). Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annual Review of Medicine*. 50: 223–236.

Inceni, R. N., Hernández, M., Cortez, J., González, M. E. and Salazar, Y. D. (2010). *Staphylococcus warneri* meningitis in a patient with *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and lymphoma: first report of a case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 52: 169–170.

Ito, T., Katayama, Y. and Hiramatsu, K. (1999). Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43: 1449–1458.

Johnston, M., Landers, S., Noble, L., Szucs, K. and Viehmann, L. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *American Academy of Pediatrics*. 129: 827–841.

Kawada, M., Okuzumi, K., Hitomi, S. and Sugishita, C. (2003). Transmission of *Staphylococcus aureus* between healthy, lactating mothers and their infants by breastfeeding. *J. Hum. Lact.* 19: 411–417.

Kayiran, P. G., Can, F., Kayiran, S. M., Ergonul, O. and Gürakan B. (2014). Transmission of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* to a preterm infant through

breast milk. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 27: 527–529.

Keyworth, N., M. R. Millar, K. T. Holland 1992. Development of cutaneous microflora in premature neonates. – Archives of disease in childhood. Volume 67, Issue 7, 797–801.

Klingenberg, C., Aarag, E., Rønnestad, A., Ericson Sollid, J., Abrahamsen, T. G., Kjeldsen, G. and Flægstad, T. (2005). Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. The Pediatric Infectious Disease Journal. 24: 817–822.

Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical Investigation. 111: 1265–1273.

Lutsar, I., Mikelsaar, M., Karki, T. 2007. Meditsiiniline mikrobioloogia 2. osa. Tartu.

Lindemann, P. C., Foshaugen, I. and Lindemann, R. (2004). Characteristics of breast milk and serology of women donating breast milk to a milk bank. Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. 89: F440–F441.

Marathe, N. P., Nagarkar, S. S., Vaishampayan, A., Rasane, M. H., Samant, S. A., Dohe, V., Kagal, A., Shouche, Y. and Deshpande, N. (2015). High prevalence of class 1 integrons in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from India. Indian Journal of Medical Microbiology. 33: 231–236.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L. and Rodríguez, J. M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. The Journal of Pediatrics. 143: 754–758.

Martín, R., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H. and Rodríguez, J. M. (2007). Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. Research in Microbiology. 158: 31–37.

Martins, A. and Lourdes R. S. Cunha, M. de (2007). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiology and Immunology. 51: 787–795.

Meditsiinisõnastik 2004. P. Bogovski, R. Kull, S. Ootsing ja L. Trapido (toim.). Medicina.

Mikelsaar, M., Karki, T., Lutsar, I., Mänder, R. 2006. Meditsiiniline mikrobioloogia 1. osa. Tartu.

Misawa, Y., Yoshida, A., Okugawa, S. and Moriya, K. (2014). First reported case of

Staphylococcus condimenti infection associated with catheter-related bacteraemia. *New Microbes and New Infections*. 3: 18–20.

Nascimento, T. C., Silva, V. L. da, Ferreira-Machado, A. B. and Diniz, C. G. (2015). Potential spread of multidrug-resistant coagulase-negative staphylococci through healthcare waste. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 9: 29–34.

Nijjar, C. K., Smith, M. H. and Eltringham, I. J. (2014). Adjunctive *mecA* PCR for routine detection of methicillin susceptibility in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 52: 1678–1681.

Novak, F. R., Silva, A. V. R. da, Hagler, A. N. and Figueiredo, A. M. S. (2000). Contamination of expressed human breast milk with an epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone. *Clinical Microbiology*. 49: 1109–1117.

Novick, R. and Bouanchaud, D. (1971). Extrachromosomal nature of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Ann. NY Acad. Sci.* 182: 279–294.

Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*. 64: 175–188.

Pantosti, A., Sanchini, A. and Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*. 2: 323–334.

Pereira, V. C. and Cunha, M. L. R. S. da (2013). Coagulase-negative staphylococci strains resistant to oxacillin isolated from neonatal blood cultures. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 108: 939–942.

Rasigade, J. P., Said, M. B., Butin, M., Picaud, J.-C. and Laurent, F. (2013). Management of late-onset sepsis due to coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care units. *Archives de Pédiatrie*. 20: 1028–1033.

Rinne, M. M., Gueimonde, M., Kalliomäki, M., Hoppu, U., Salminen, S. and Isolauri, E. (2005). Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 43: 59–65.

Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F. 1989. *In* Sambrook, J., Maniatis, T. (eds.), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, New York.

Savini, V., Catavittello, C., Bianco, A., Balbinot, A., and D'Antonio, D. (2009). Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteuri*: from mammals and lampreys, to man. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 4: 123–129.

Schleifer, K.-H. and Bell, J. A. 2009. Genus I. *Staphylococcus*, p 392–421. In P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer and W. Whitman (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3. Springer.

Shuttleworth, R., Behme, R. J., McNabb, A. and Colby, W. D. (1997). Human isolates of *Staphylococcus caprae*: association with bone and joint infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 2537–2541.

Smyth, D. S., Wong, A. and Robinson, D. A. (2011). Cross-species spread of SCCmec IV subtypes in staphylococci. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 446–453.

Soeorg, H., Huik, K., Parm, Ü., Ilmoja, M.-L., Metelskaja, N., Metsvaht, T. and Lutsar, I. (2013). Genetic relatedness of coagulase-negative staphylococci from gastrointestinal tract and blood of preterm neonates with late-onset sepsis. *The Pediatric infectious disease journal*. 32: 389–393.

Spencer, J. P. 2008. Management of mastitis in breastfeeding women. *Am. Fam. Physician*. 78: 727–731.

Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., Lemons, J. A., Donovan, E. F., Stark, A. R., Tyson, J. E., Oh, W., Bauer, C. R., Korones, S. B., Shankaran, S., Laptook, A. R., Stevenson, D. K., Papile, L.-A. and Poole, W. K. (2002). Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 110: 285–292.

Strominger, J. L., Park, J. T. and Thompson, R. E. (1959). Composition of the cell wall of *Staphylococcus aureus*: its relation to the mechanism of action of penicillin. *The Journal of Biological Chemistry*. 294: 3263–3268.

Zwet, W. C. Van Der, Debets-Ossenkopp, Y. J., Reinders, E., Kapi, M., Savelkoul, P. H. M., Elburg, R. M. Van, Hiramatsu, K. and Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (2002). Nosocomial spread of a *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to vancomycin in

a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 2520–2525.

Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A., Baba, S., Fukui, S., Lee, J. C. and Hiramatsu, K. (2005). Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *Journal of Bacteriology*. 187: 7292–7308.

Vannuffel, P., Gigi, J., Ezzedine, H., Vandercam, B., Delmee, M., Wauters, G. and Gala, J.-L. (1995). Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 2864–2867.

Versalovic, J., 2011. Manual of clinical microbiology. 10th edition. ASM Press, Washington, DC.

Welsh J. K. and May, J. T. (1979). Anti-infective properties of breast milk. *The Journal of Pediatrics*. 94: 1–9.

Witt, A., Mason, M. J., Burgess, K., Flocke, S. and Zyzanski, S. (2014). A case control study of bacterial species and colony count in milk of breastfeeding women with chronic pain. *Breastfeeding Medicine*. 9: 29–34.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Abbey, D. (1997). Graphical explanation of basic phylogenetic terms. <http://www.ucmp.berkeley.edu/glossary/gloss1/auphyly.html>. Vaadatud 10.04.2015.

Baviera, G., Leoni, M. C., Capra, L., Cipriani, F., Longo, G., Maiello, N., Ricci, G. and Galli, E. (2014). Microbiota in healthy skin and in atopic eczema. BioMed Research International. Volume 2014. <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/436921/>. Vaadatud 24.03.2015.

Delgado, S., Arroyo, R., Jiménez, E., Marín, M. L., Campo, R. del, Fernández, L. and Rodríguez, J. M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. BMC Microbiology. 9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.utlib.ee/pmc/articles/PMC2685400/>. Vaadatud 22.04.2015.

Dong, Y. and Speer, C. P. (2014). Late-onset neonatal sepsis: recent developments. – Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition. <http://fn.bmj.com/content/early/2014/11/25/archdischild-2014-306213.full>. Vaadatud 6.05.2014.

Du, X., Zhu, Y., Song, Y., Li, T., Luo, T., Sun, G., Yang, C., Cao, C., Lu, Y. and Li, M. (2013). Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. PLoS ONE. 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675424>. Vaadatud 25.03.2015.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System. <http://www.earss.rivm.nl>. Vaadatud 21.05.2015.

Jiménez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albújar, M., García, N., Jarrod, M., Fernández, L., Gómez, A. and Rodríguez, J. M. (2008). *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. BMC Microbiology. 8. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/143>. Vaadatud 18.03.2015.

Lifetechnologies. <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/R0611>. Vaadatud 12.05.2015.

McElroy, S. J. and Weitkamp, J.-H. (2011). Innate Immunity in the Small Intestine of the

Preterm Infant. NeoReviews.

<https://neoreviews.aappublications.org/content/12/9/e517.abstract>. Vaadatud 6.05.2015.

MedlinePlus. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000666.htm>. Vaadatud 16.04.2015.

Merck Manual. <http://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-positive-cocci/staphylococcal-infections>. Vaadatud 21.05.2015.

Misic, A. M., Davis, M. F., Tyldsley, A. S., Hodgkinson, B. P., Tolomeo, P., Hu, B., Nachamkin, I., Lautenbach, E., Morris, D. O. and Grice, E. A. (2015). The shared microbiota of humans and companion animals as evaluated from *Staphylococcus* carriage sites. Microbiome. 3.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.utlib.ee/pmc/articles/PMC4335418/>. Vaadatud 24.03.2015.

Ternes, Y. M., Lamaro-Cardoso, J., André, M. C. P, Pessoa Jr., V. P., Silva Vieira, M. A. da, Minamisava, R., Andrade, A. L. and Kipnis, A. (2013). Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* carriage in neonates admitted to an intensive care unit in Brazil. BMC Infectious Diseases. 13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24308773>. Vaadatud 7.04.2015.

Vendemiato, A. V. R., Nowakonski, A. von, Marson, F. A. L. and Levy, C. E. (2015). Microbiological characteristics of sepsis in a University hospital. BioMed Central Infectious Diseases. 15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.utlib.ee/pmc/articles/PMC4334605/>. Vaadatud 7.05.2015.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____
(*juhendaja nimi*)

1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
- 6) olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
- 7) kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____ (*kuupäev*)